

PROTEOMIC ANALYSIS: UNCOVERING THE SIGNALING PATHWAYS IN PLANTS

Černý M., Brzobohatý B.

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: martincerny83@gmail.com

ABSTRACT

Genomic assays have been widely used to elucidate responses to stimulus, but many biological processes are still unclear. In these cases, a new approach should be used, which would reflect responses preceding the transcriptomic ones or independent of mRNA expression, for example response transduced through posttranslational modification of proteins. Phosphorylation is one of the most important posttranslational modifications of proteins. At least 5% of *Arabidopsis thaliana* genome is responsible for regulation of protein phosphorylation, which indicates that nearly all aspects of cell function involve reversible phosphorylation. It is also a major issue in modern proteomics. We present the use of proteomics in study of plant signaling and possible way to uncover external stimulus perception in plants.

Key words: fosfoproteome, proteomic analysis

Acknowledgments: This work is supported by LC06034 and 1M06030.

ÚVOD

Zatímco v minulosti se přikládal nejvyšší význam genomickým studiím a analýzám profilování RNA pomocí DNA čipů, dnes získává na stále větším významu analýza proteomu. Proteomická analýza je schopna reflektovat změny v okamžité odpovědi organismu na stimulus, které nemusí být vůbec závislé na regulaci genové exprese. Příkladem mohou být posttranslační regulace enzymů, které hrají klíčovou roli v mnoha aktivačních drahách buňky, ale i celých organismů. Vedle regulované proteolýzy, která se uplatňuje například při řízení krevního srážení, je v dnešní době asi nejvíce sledovanou posttranslační modifikací fosforylace. Náš předcházející proteomický výzkum odhalil významnou roli fosforylace v brzké odpovědi rostliny na hormon cytokinin (Černý et al., 2009). Navíc se nám podařilo nalézt mnohá zajímavá spojení mezi recepty cytokininů a dalšími stimulanty. Potenciální spojení mezi recepty teploty a cytokininů poskytlo důkaz, že fosfoproteomické metody by mohly být použity při odhalení dosud stále neznámého mechanismu percepcie teploty v rostlinách (Penfield, 2008).

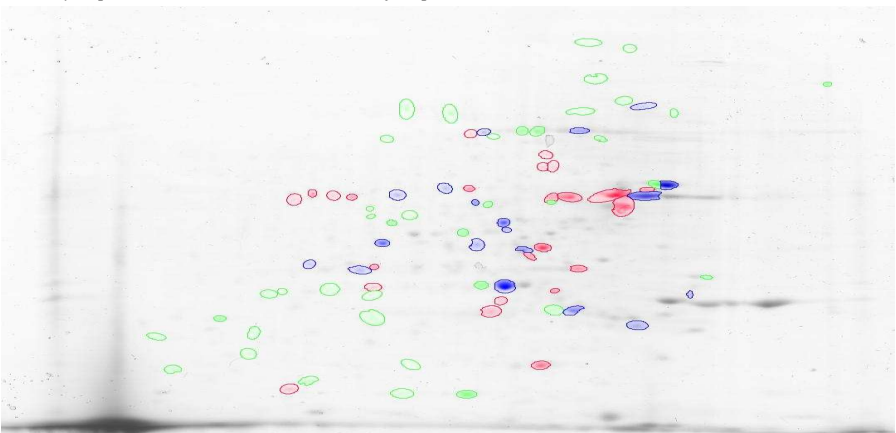
MATERIÁL A METODIKA

Semenáčky *Arabidopsis thaliana* var. Columbia byly kultivovány 7 dní při standardních světelných podmínkách dlouhého dne ($\sim 90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), teplotě 21/19°C (den/noc). Poté byly přeneseny na temperované medium a vystaveny po dobu 15 min teplotnímu šoku (0°C, 36°C). Fosfoproteom byl izolován zavedenou metodou (Černý, Brzobohatý, 2008) pomocí kitu na izolaci fosfoproteinů (Qiagen). Získaný protein byl separován pomocí standardní 2D elektroforézy (Bio-Rad) a výsledné proteinové mapy porovnány pomocí analýzy obrazu (Decodon Delta 2D).

VÝSLEDKY A DISKUZE

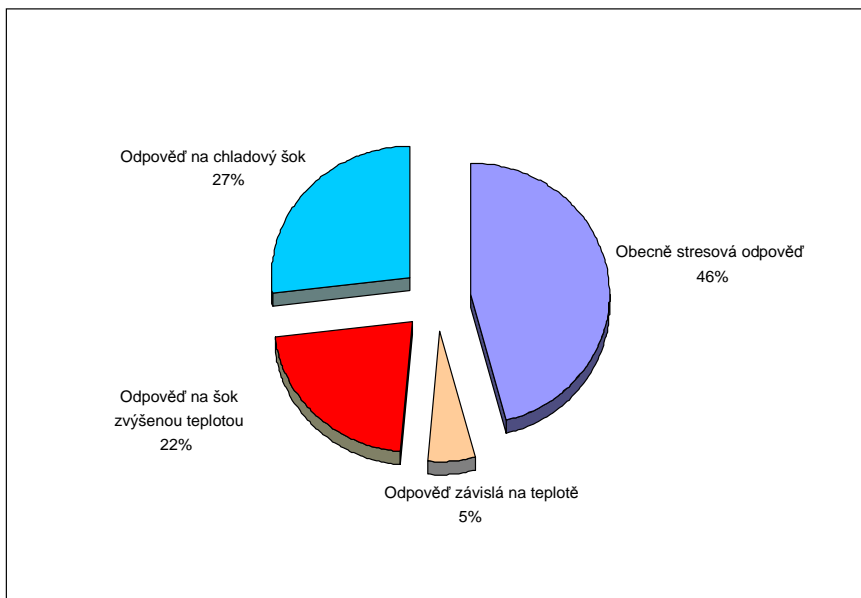
Byl analyzován fosfoproteom rostlin vystavených teplotnímu šoku a porovnán s rostlinami za normálních podmínek. Průměrný obraz fosfoproteomu měl 410 ohraničených proteinových spotů (Obr. 1)

Tab. 1 Fosfoproteomická mapa semenáčku Arabidopsis. Zvýrazněné proteinové spoty reagují na změny v teplotních podmínkách: červená – maximální objem po tepelném šoku, zelená – maximální objem za běžných podmínek, modrá – maximální objem při stimulaci chladem



Mezi 410 spoty bylo pozorováno 57, které vykazovaly odpověď na stimulus. Tato odpověď lze rozdělit na obecně stresovou, odpověď na chlad, odpověď na horko a proteiny jejichž fosforylace se zdá být přímo či nepřímo úměrná teplotě okolí (Graf 1).

Graf 1 Zastoupení stimulů ovlivňujících fosforylace a defosforylace proteinů.



ZÁVĚR

Byla prokázána výrazná role fosfoproteomu v zprostředkování teplotní odpovědi v *Arabidopsis*. Přibližně 1/8 ze všech pozorovaných proteinových spotů na fosfoproteomické 2D mapě se nějakým způsobem zapojuje do teplotních odpovědí rostliny. Zhruba polovinu těchto spotů lze považovat za obecnou odpověď na stres, zbývající část se však zdá být regulována buď chladem, nebo horkem, u 5% proteinů byla dokonce pozorována přímá či nepřímá úměra mezi teplotou a úrovní fosforylace.

LITERATURA

Černý M., Brzobohatý B. (2008): Isolation of phosphoproteome and its application in study of the effect of cytokinin on plants. *MendelNET 2008. Sborník příspěvků z konference studentů doktorského studia*. Brno: Mendelova Zemědělská a Lesnická Univerzita v Brně, 2008, s. 105. ISBN 978-80-7375-239-2.

Černý M., Dyčka F., Bobálová J., Brzobohatý B. (2009): Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. V tisku.

Penfield S. (2008): Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol*, 179, 615-628.